

XP-002320140

(C) WPI/Derwent

AN - 1993-104293 [13]

AP - JP19910224695 19910808

CPY - KANE

DC - B04 J04 S03

FS - CPI;EPI

IC - C07K17/02 ; G01N27/327 ; G01N33/543 ; G01N33/544

MC - B04-B04A6 B04-B04C2 B04-B04C6 B11-C07A B11-C08B B12-K04A J04-C04

- S03-E03C S03-E14H4

M1 - [01] M423 M710 M903 N102 P831 Q435 V600 V611 V752

M6 - [02] M903 P831 Q435 R515 R528 R621 R622 R627 R630 R631

PA - (KANE) KANEBO LTD

PN - JP5043600 A 19930223 DW199313 C07K17/02 009pp

PR - JP19910224695 19910808

XA - C1993-046218

XIC - C07K-017/02 ; G01N-027/327 ; G01N-033/543 ; G01N-033/544

XP - N1993-078957

AB - J05043600 Silk fibroin membrane is claimed on which an antibody or an antigen is immobilised by covalent bond, pref. by using glutaraldehyde or its polymer or cyanuric chloride as the bonding reagent. A sensor for immunoassay is prepd. by equipping a silk fibroin membrane on which an antibody or an antigen is immobilised by covalent bond on an electrode device.

- USE/ADVANTAGE - The membrane can reduce the amt. of antibody used and can give a measurement of higher precision.

- In an example, 5.7 wt. % aq. soln. of fibroin is prepd. from 100g raw silk. Glycerol is added to it to 30 wt. % based on fibroin and the mixt. is spread on a glass plate and dried at 20 deg.C for 10 hrs. to give a silk fibroin membrane. An aq. soln of glutaraldehyde is diluted by 0.1M borate buffer to 1 wt. % and heated at 60 deg. C for 1 hr. to give an aq. soln. for its polymer. The membrane is immersed in it at room temp. for 3 hrs. and washed with 0.01 M phosphate buffered physiological saline soln. to remove unreacted glutaraldehyde polymer. The membrane is immersed in 0.01M phosphate buffered physiological saline soln. contg. 50 micro mg/ml antihuman AFP mouse monoclonal antibody at room temp. for 15 hrs. and then washed with 0.01M phosphate buffered physiological saline soln. It is immersed in 0.1M phosphate buffer contg. 1M lysine and washed with 0.01M phosphate buffered physiological saline soln. and stored in 0.01M phosphate buffered physiological saline soln. contg. 0.1 wt. % Na azide. A sensor is prepd. by equipping the membrane, an oxygen permeating membrane and a galvanic oxygen electrode in a reactor cell(Dwg.0/3)

IW - ANTIBODY ANTIGEN IMMOBILISE SILK FIBROIN SENSE IMMUNOASSAY ANTIBODY ANTIGEN IMMOBILISE COVALENT BOND GLUTARALDEHYDE POLYMER CYANURIC CHLORIDE BOND REAGENT

IKW - ANTIBODY ANTIGEN IMMOBILISE SILK FIBROIN SENSE IMMUNOASSAY ANTIBODY ANTIGEN IMMOBILISE COVALENT BOND GLUTARALDEHYDE POLYMER CYANURIC CHLORIDE BOND REAGENT

NC - 001

OPD - 1991-08-08

ORD - 1993-02-23

PAW - (KANE) KANEBO LTD

TI - Antibody- or antigen-immobilised silk fibroin for sensor or immunoassay - In which antibody or antigen is immobilised by covalent bond using glutaraldehyde or its polymer or cyanuric chloride as bonding reagent

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-43600

(43)公開日 平成5年(1993)2月23日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 17/02		7731-4H		
G 0 1 N 27/327				
33/543	C	7906-2 J		
33/544	Z	9015-2 J		
		7235-2 J		
			G 0 1 N 27/ 30	3 5 7
			審査請求 未請求	請求項の数3(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平3-224695	(71)出願人	000000952 鐘紡株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(22)出願日	平成3年(1991)8月8日	(72)発明者	葛原 亜起夫 大阪市都島区友浜町1丁目6番地10-201
		(72)発明者	名倉 哲 大阪市都島区友浜町2丁目12番地21-301
		(72)発明者	中山 博 大阪府枚方市東山1丁目38番5号

(54)【発明の名称】 抗体または抗原固定化絹フィブロイン膜および免疫測定用センサー

(57)【要約】

【目的】 抗体又は抗原が均一に固定化された膜および該膜を用いた、バラツキのない高精度の測定が可能な免疫センサーを提供することにある。

【構成】 グルタルアルデヒド重合体又は、塩化シアヌル等を用いた共有結合により、抗体または抗原を固定化した絹フィブロイン膜および該膜を装着してなる免疫測定用センサー。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 共有結合により抗体または抗原を固定化した絹フィブリン膜。

【請求項2】 共有結合の方法がグルタルアルデヒド又はその重合体あるいは塩化シアヌルを結合試薬として用いるものである請求項1記載の絹フィブリン膜。

【請求項3】 共有結合により抗体または抗原を固定化した絹フィブリン膜を電極デバイスに装着してなる免疫測定用センサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床検査などの免疫測定試薬として用いられる抗体または抗原を固定化した絹フィブリン膜に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原抗体反応の高い特異性を利用して検体中に含まれる特定の抗原あるいは抗体を、定性的にあるいは定量的に測定するために種々の免疫学的測定法が用いられており、代表的なものとして酵素免疫測定法

(EIA)、放射免疫測定法(RIA)等が知られているが、こうした免疫学的試験法に於いては、一般に測定対象の抗原(あるいは抗体)に対応する抗体(あるいは抗原)を化学結合法、吸着法あるいは包括法によって固定化した不溶性担体(固相)と、酵素または放射性同位元素などで標識した抗体(あるいは抗原)とが用いられる。

【0003】こうした固相抗体の一つとして、抗体を包括固定化した絹フィブリン膜が報告されており、これを酸素電極に装着することを特徴とする免疫センサーが、高感度、且つレンジの広い測定が可能であるとともに繰り返し使用に耐え、有用性の高いものであることが特開昭63-117253号に於いて開示されている。この抗体固定化絹フィブリン膜を用いた免疫センサーにより高感度な測定が可能である理由の一つとして、絹フィブリン膜自体の酸素透過性が他の膜に比べて非常に優れていることが挙げられる。

【0004】ところが、包括法による抗体固定化絹フィブリン膜は、優れた性能を有している反面、抗体を固定化する際の使用抗体量がやや多く、抗体固定化量を制御しにくいほか、膜に均一に固定化しにくいといった欠点を有していた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述の欠点に鑑みなされたものであって、その目的とするところは、抗体または抗原が均一に固定化された絹フィブリン膜を提供するにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上述の目的は、共有結合により抗体または抗原を固定化した絹フィブリン膜および該絹フィブリン膜を電極デバイスに装着してなる

免疫測定用センサーにより達成される。

【0007】本発明に用いられる抗体としては、例えば以下のようなものが具体例として挙げられる。

(1) インシュリン、絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、胎盤性ラクタゲン、黄体形成ホルモン等のポリペプチド系ホルモンの抗体。

(2) IgG, IgA, IgM, IgE, α -フェトブロテイン(AFP)、カルシノエンブリオニックアンチゲン、C-反応性蛋白(CRP)、 α 1-アシッドグロブリン(AGP)、ハプトグロビン等の血清蛋白の抗体。

(3) 大腸菌毒素、コレラトキシン、肝炎ウィルス、風疹ウィルス、インフルエンザウィルス等の毒素あるいはウィルスの抗体。

(4) エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、フェニトイン、プロカインアミド、カナマイシン、ペニシリン、バルビツール酸等のステロイドホルモンあるいは薬剤の抗体。

【0008】これら抗体の種類は、IgG, IgA, IgM等のクラス、あるいはこれらの抗体フラグメントいずれをも使用することが出来る。また、マウス、ラット、ウサギ、ヤギあるいはヒト等から常法によって採取した抗体を使用することが出来るが、特に細胞融合法によって採取したモノクローナル抗体の使用が均質な抗体が得られ、感度、精度の点で好ましい。なお、通常使用する抗体はいずれも常法によって例えば、硫酸塩析またはDEAEイオン交換カラムクロマトグラフィー等で精製して用いられる。

【0009】本発明に用いられる抗原としては、分子内にアミノ基等の官能基を有するものならばいずれの使用も可能であり、上記抗体に対応する抗原等が挙げられる。

【0010】本発明に用いられる絹フィブリン膜としては、生糸を石けん水溶液中に浸漬し、水、エチルアルコール、塩化カルシウムと混合し、透析脱塩した後、グリセリンを加え、ガラス板上に流延して乾燥したもの等を用いることができる。絹フィブリン膜を製膜する際の基板としては、ガラス板、アクリル板等が挙げられるが、粗面板を用いることが好ましい。

【0011】抗体あるいは抗原を絹フィブリン膜に結合させる方法としては、一般的な二官能性以上の結合剤や縮合剤等の結合試薬を用いることができる他、スパーサーを介して結合させる方法も用いられる。絹フィブリン膜、及び抗体(あるいは抗原)のアミノ基、カルボキシル基、水酸基等の官能基が結合に有効に利用されるが、結合試薬の例を示すと、アミノ基相互間の結合試薬(例えばジメチルスクシンイミデート等のアルキルジイミデート類、酒石酸ジアジド等のアシルアジド類、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等のアリールジハライド類、キシレン-m-ジイソシアネート等の

イソシアネート類、N, N' - o - フェニレンジマレイミド等のジマレイミド類、その他、グルタルアルデヒド等のジアルデヒド類、グルタルアルデヒド重合体、ブロムシアン、塩化シアヌル等)、アミノ基とチオール基間の結合試薬(例えば、メチル-4-メルカプトブチルイミデート等のメルカプトアルキルイミデート類、γ-マレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等のマレイミドカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル類)、水酸基とアミノ基間の結合試薬(ブロムシアン、塩化シアヌル等)、あるいはカルボキシル基とアミノ基間の結合試薬(例えば1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド等の水溶性カルボジイミド類)等が挙げられる。

【0012】中でも、グルタルアルデヒド(特に重合化処理を施したもの)あるいは塩化シアヌルを結合試薬として用いたものは、免疫センサー系における繰り返し測定安定性能が良好であり、特に好ましい。

【0013】グルタルアルデヒド重合体は、グルタルアルデヒドから自然発生的に生成するが、アルカリ存在下60℃中で数時間熱処理することによっても得られる。また、グルタルアルデヒド水溶液に3級アミン、例えばトリエチルアミンを触媒量添加することによっても得られる(特開平2-49587号公報)。

【0014】このような結合試薬を反応させた絹フィブロイン膜を、 $3.125 \times 10^{-8} \text{M} \sim 6.25 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度の上記抗体あるいは抗原溶液中で4℃~40℃の範囲内で数10分~数10時間反応させ、よく洗浄する。

【0015】更に本発明の抗体または抗原固定化絹フィブロイン膜は、蛋白質、ペプチド、或はアミノ酸溶液中で4~40℃の範囲内で数時間反応させてブロッキングすることによって、非特異吸着を抑えることができる。ブロッキングに用いる蛋白質、ペプチド、アミノ酸としては、牛血清アルブミン、卵白アルブミン等の蛋白質、グリシン、アラニン、リジン、アルギニン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸及びペプチド類等が挙げられる。

【0016】本発明の免疫測定用センサーの電極デバイスとしては、酸素電極、塩素電極、過酸化水素電極等が挙げられるが、酸素透過性が良いというフィブロイン膜の特徴を生かせる点で酸素電極が特に好ましい。

【0017】以下実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、それに先立って、実施例で用いた絹フィブロイン膜の製造例及び免疫測定に用いる酵素標識抗体の製造例を参考例として示す。

【0018】

【参考例】

参考例1(絹フィブロイン膜の製造)

(1) フィブロイン水溶液の調製

生糸100gを1.0重量%のマルセル石けん水溶液5

000ml中に浸漬し、80℃で3時間精練した。水洗後、更に0.5重量%のマルセル石けん水溶液5000mlに浸漬して80℃で3時間精練し、セリシン等を実質的に除去したフィブロイン原料72gを得た。水100gとエチルアルコール80gの入ったニーダー中に塩化カルシウム150gを溶解し、75℃に昇温後、上記のフィブロイン原料70gを投入し、1時間攪拌下に溶解した。次いで、180gの温水(75℃)を加えて希釈した。これを冷却した後、ホローファイバー型の透析器を用いて、流水に対して透析脱塩し、5.7重量%のフィブロイン水溶液1200mlを得た。塩化カルシウムの残存量は0.08%であった。

【0019】(2) 絹フィブロイン膜の製造

前記(1)のフィブロイン水溶液にグリセリンをフィブロインに対して30重量%加え、その溶液を四方を区切ったガラス板に流延し、20℃で10時間乾燥することによって皮膜化させ、はく離することにより絹フィブロイン膜を得た。

【0020】参考例2(絹フィブロイン膜の製造)

参考例1の(1)のフィブロイン水溶液にグリセリンをフィブロインに対して30重量%加え、その溶液を四方を区切ったアクリル板に流延し、20℃で10時間乾燥することによって皮膜化させ、はく離した。次いで、この膜を80%メタノール水溶液中に室温で3分間浸漬させることにより不溶性の絹フィブロイン膜を得た。

【0021】参考例3(カタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体の製造)

(1) チオール化カタラーゼの製造

カタラーゼ溶液0.166ml(含量15mg)を0.05Mリン酸緩衝液(pH8.0)で、2.5mlに希釈し、窒素曝気を60ml/分で10分間行い、次にメチル-4-メルカプトブチルイミデート1mgを加え、窒素雰囲気下に4℃で2時間反応させた。反応終了後、窒素雰囲気のままダイアフローメンブラン(アミコン社製)を用いて限外濾過により濃縮し、これに0.05Mリン酸緩衝液3ml(pH7.0)を加え、再び限外濾過した。この操作を3回繰り返して未反応のメチル-4-メルカプトブチルイミデートを除き、チオール化カタラーゼ溶液3mlを得、窒素雰囲気下で保存した。

【0022】(2) マレイミド化抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体の製造

抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体溶液0.42ml(含量10mg)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で5.0mlに希釈し、N-(γ-マレイミドブチロキシ)スクシンイミド(GMBS)0.5mgをジオキサン0.5mlに溶かして加えた。4℃で2時間反応させた後、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)1000mlで透析(2時間)を2回行ってマレイミド化抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体溶液6ml(含量10mg)を得た。

【0023】(3)カタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体の製造

(1)で製造したチオール化カタラーゼ溶液2ml(含量10mg)と(2)で製造したマレイミド化抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体溶液3ml(含量5mg)とを窒素雰囲気下で混合し、4℃で16時間反応させた。未反応のマレイミド基をブロックするためシステイン1mgを加え4℃で30分間反応後、12000rpm、5分間の遠心分離で沈殿物を除去し、高速液体カラムクロマトグラフィーによって目的物を分離精製した。カラムは、Sephadex G-3000SW(東洋ソーダ製)を用い、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出し、最初の画分を集めカタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体溶液12ml(含量4mg)を得た。

【0024】

【実施例】

実施例1

(グルタルアルデヒド重合体を結合試薬とする方法)市販グルタルアルデヒド水溶液を0.1Mホウ酸緩衝液(pH11)にて1重量%に希釈し、60℃で1時間熱処理することによりグルタルアルデヒド重合体水溶液を得た。次いで参考例1で製造した絹フィブロイン膜を1重量%グルタルアルデヒド重合体水溶液中に室温で3時間浸漬させ、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄し、未反応のグルタルアルデヒド重合体を除去した。更にこの膜を50μg/mlの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(IgG)を含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水pH7.2中に室温で15時間浸漬し、次いでこの膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。その後、この膜を1Mリジンを含有する0.1Mリン酸緩衝溶液で室温下3時間浸漬することによりブロッキング処理を行い、更に、この膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した後、0.1重量%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で4℃にて保存した。

【0025】実施例2

(塩化シアヌルを結合試薬とする方法)参考例2で製造した絹フィブロイン膜を50mlの蒸留水中に浸漬させ、溶液中のpHを8~9に調整しながら室温で0.5gの塩化シアヌルを含有するアセトン溶液10mlを10分間で滴下し、1N塩酸を滴下してpHを3にし反応を停止させた。この溶液から膜を取り出し、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。更に、この膜を50μg/mlの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(IgG)を含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中に室温で15時間浸漬し、次いでこの膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。その後、この膜を1Mリジンを含有する0.1Mリン酸緩衝溶液で室温下3時間浸漬することによりブロッ

キング処理を行い、更に、この膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した後、0.1重量%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で4℃にて保存した。

【0026】実施例3

(ブロムシアン法)参考例1で製造した絹フィブロイン膜を10mlの蒸留水中に浸漬させ、溶液中のpHを11~12に調整しながら室温で2.5重量%のブロムシアンを含有する蒸留水8mlを5分間で滴下し、この溶液から膜を取り出し、0.1Mの炭酸水素ナトリウム緩衝溶液(pH9)で洗浄した。更に、この膜を50μg/mlの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(IgG)を含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中に室温で15時間浸漬し、次いでこの膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。その後、この膜を1Mリジンを含有する0.1Mリン酸緩衝溶液で室温下3時間浸漬することによりブロッキング処理を行い、更に、この膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した後、0.1重量%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で4℃にて保存した。

【0027】実施例4

(アジド法)参考例1で製造した絹フィブロイン膜を0.5Nの硫酸を含有するメタノール中に室温で24時間浸漬し、蒸留水で洗浄する。この膜を1重量%のヒドラジン水溶液に室温で24時間浸漬し、蒸留水で洗浄した。次いで、この膜を0.5Mの亜硝酸ナトリウムを含有する0.3Nの塩酸中に0℃で5分間浸漬し、蒸留水で洗浄した。更に、この膜を50μg/mlの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(IgG)を含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中に室温で15時間浸漬し、次いでこの膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。その後、この膜を1Mリジンを含有する0.1Mリン酸緩衝溶液で室温下3時間浸漬することによりブロッキング処理を行い、更に、この膜を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した後、0.1重量%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で4℃にて保存した。

【0028】実施例5

(グルタルアルデヒドモノマーを結合剤とする方法)参考例1で製造した絹フィブロイン膜を10重量%グルタルアルデヒドモノマーを含有する0.2Mの炭酸水素ナトリウム緩衝溶液(pH9)中に室温で3時間浸漬させ、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄し、未反応のグルタルアルデヒドモノマーを除去した。更にこの膜を50μg/mlの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(IgG)を含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水中に室温で15時間浸漬し、次いでこの膜を0.1Mの水素化ホウ素ナトリウム水溶液中0℃で3分

間浸漬し、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水で十分洗浄した。その後、この膜を1Mリジンを含有する0.1Mリン酸緩衝溶液で室温下3時間浸漬することによりブロッキング処理を行い、更に、この膜を0.01M生理食塩水で十分洗浄した後、0.1重量%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で4℃にて保存した。

【0029】比較例1

(包括法) 抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体(1gG)を生理食塩水に溶解し、250μg/mlの抗体溶液を調製した。次に、この溶液を四方を区切ったガラス板上に抗体量が20μg/cm²となるように流延し、15℃で3時間乾燥した。参考例1の(1)のフィブリン水溶液にグリセリンをフィブリンに対して30重量%加え、その溶液を抗体が塗布されたガラス板に流延し、20℃で10時間乾燥することによって皮膜化させ、はく離した。これを直径8mmの円形に裁断し、厚さ60μmの抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体固定化絹フィブリン膜を得た。

【0030】実施例6

(ヒトAFP測定用免疫センサーの作成) 図5に示すように、反応セル(容量0.2ml)に本発明によって製造された抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体固定化絹フィブリン膜(実施例1, 2)、あるいは抗ヒトAFP抗体固定化絹フィブリン膜(比較例1)、酸素透過膜、Oリング及びガルバニ型酸素電極(AN型、オリエンタル電気株式会社製)を順次装着してヒトAFP測定用の酸素検出型免疫センサーを作成した。

【0031】

【試験例】以下、試験例を挙げて本発明の効果を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0032】試験例1

抗体固定化量の均一性評価試験

(1) 試料

実施例1及び比較例1の絹フィブリン膜

【0033】(2) 試験方法

直径8mmの円形に打ち抜いた試料を0.01Mのリン酸緩衝生理食塩水液(pH7.2)で十分洗浄し、濾紙で抜き取り、次いで内径1.3mmのガラス試験管に入れ、以下の試験を行った。

【0034】ヒトα-フェトプロテイン(以下AFPと記す)0と1000ng/mlを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(0.5%牛血清アルブミン含有)0.5mlを前記のガラス試験管に入れ、37℃で2時間免疫反応を行った。次に、蒸留水3mlで3回洗浄後、参考例3で製造した(特開昭63-101754号公報に開示)カタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体11μg/mlを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(0.5%牛血清アルブミン含有)0.5mlを同試験管に入れ、37℃で2時間免疫反応を行った。更に、蒸留水3mlで3回洗浄後、0.02M過酸化水素-0.01Mリン酸緩衝生理食塩水1.0mlを加え、10分間酵素反応を行った後、1規定硫酸1.0mlを加えて反応を停止させ、過酸化水素に基づく240nmの吸光度(A240)を測定した。この測定から得られたAFP0ng/mlと1000ng/mlを加えた時の吸光度差(n=5)から算出したCV値(%)を比較することにより、抗体固定化量の均一性評価を行った(CV値=(標準偏差/平均値)×100; このCV値が低い程、均一性が高いことを表す。)

【0035】尚、0.02M過酸化水素-0.01Mリン酸緩衝生理食塩水1.0mlに1規定硫酸1.0mlを添加した時の吸光度(A240)をブランク値とした。

【0036】

【表1】

ブランク値 0.4619 (I)

	固定化方法	AFP 0ng/ml (II)	AFP 1000ng/ml (III)	活 性		
				(II)-(III)	平均値	CV値(%)
実施例1	GA重合体による結合	0.4644	0.3666	0.0978	0.0904	4.26
			0.3777	0.0867		
			0.3750	0.0894		
			0.3761	0.0883		
			0.3746	0.0898		

比較例1	包括法	0.4650	0.3547 0.3600 0.3552 0.3384 0.3593	0.1103 0.1050 0.1098 0.1266 0.1057	0.1115	7.04
------	-----	--------	--	--	--------	------

【0037】表1からわかる通り、本発明によって製造された共有結合法による抗体固定化絹フィブロイン膜は、比較例1の包括法による抗体固定化絹フィブロイン膜と比べてCV値が低く、抗体固定化量が均一であり、そのためバラツキのより少ない高精度の測定が可能という点で優れたものであった。

【0038】試験例2

抗体固定化絹フィブロイン膜の性能試験

(1) 試料

本発明によって製造された共有結合法による抗体固定化絹フィブロイン膜（後述する実施例1～5）、及び包括法による抗体固定化絹フィブロイン膜（後述する比較例1）

【0039】(2) 試験方法

直径8mmの円形に打ち抜いた試料を0.01Mのリン酸緩衝生理食塩水（pH7.2）で十分洗浄し、濾紙で抜き取り、次いで内径1.3mmのガラス試験管に入れ、以下の試験を行った。

【0040】ヒト α -フェトプロテイン（以下AFPと記す）0または1000ng/mlを含有する0.01

Mリン酸緩衝生理食塩水（0.5%牛血清アルブミン含有）0.5mlを前記のガラス試験管に入れ、37℃で2時間免疫反応を行った。次に、蒸留水3mlで3回洗浄後、参考例3で製造したカタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体11 μ g/mlを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水（0.5%牛血清アルブミン含有）0.5mlを同試験管に入れ、37℃で2時間免疫反応を行った。更に、蒸留水3mlで3回洗浄後、0.02M過酸化水素-0.01Mリン酸緩衝生理食塩水1.0mlを加え、10分間酵素反応を行った後、1規定硫酸1.0mlを加えて反応を停止させ、残存過酸化水素に基づく240nmの吸光度（A240）を測定した。

【0041】尚、0.02M過酸化水素-0.01Mリン酸緩衝生理食塩水1.0mlに1規定硫酸1.0mlを添加した時の吸光度（A240）をブランク値とした。

【0042】

【表2】

ブランク値 0.4666 (I)

	固定化方法	AFP 0ng/ml (II)	AFP 1000ng/ml (III)	活性 (II)-(III)
実施例1	GA重合体法	0.4592	0.3667	0.0925
実施例2	塩化シアヌル法	0.4658	0.2852	0.1806
実施例3	BrCN法	0.4623	0.3858	0.0765
実施例4	アジド法	0.4567	0.3526	0.1041
実施例5	GAモノマー法	0.4547	0.3387	0.1160
比較例1	包括法	0.4560	0.3279	0.1281

【0043】表2からわかる通り、本発明によって製造された共有結合法による抗体固定化絹フィブロイン膜は、比較例1の包括法による抗体固定化絹フィブロイン膜と同様に、免疫測定を行うのに十分な信号量が得られることがわかった。

【0044】試験例3

免疫センサーによる抗体固定化絹フィブロイン膜の繰返し使用の安定性試験

(1) 試料

実施例1、2及び比較例1の抗体固定化絹フィブロイン

膜

【0045】(2) 試験方法

実施例6で作成した酸素検出型免疫センサーを用い、図1に示したフロー式の測定装置を組み、下記のヒトAFP標準溶液について以下のようにして繰り返し測定を行った。

【0046】即ち、ヒトAFP0又は100 ng/mlを含有する0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(0.5%牛血清アルブミン含有)をヒトAFPの標準溶液とした。そしてカタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体5.5 µg/mlを含有する同標準溶液0.5 mlを反応セル(容量0.2 ml)に導入し、7分間静置して免疫反応を行った後、20 ml/分の流速で1分間蒸留水を流して反応セルを洗浄した。次いで、26.5 mMの過酸化水素を含有する0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)0.2 mlを反応セルに導入し、酸素電極の酸素濃度に比例した電流値を求め、この値をAD変換器により、電位置に変換した。続いて、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.5、食塩2重量%含有)を20 ml/分の流速で1分間流した後、2分間静置して結合したヒトAFPとカタラーゼ標識抗ヒトAFPマウスモノクローナル抗体を解離させ、更に20 ml/分の流速で1分間蒸留水を流して反応セルを洗浄した。

【0047】操作はすべて30℃で行い、酵素反応時以外はすべて攪拌を行った。結果を図2(比較例1)、図3(実施例1)、図4(実施例2)に示す。

【0048】図2、図3、図4からわかる通り、本発明によって製造された共有結合法による抗体固定化絹フィブリン膜(特にグルタルアルデヒド重合体或いは塩化シアヌルを結合剤として用いたもの)は、比較例1の包括法による抗体固定化絹フィブリン膜と同様に、繰り

返し安定性に優れていた。

【0049】

【発明の効果】本発明の、共有結合法により抗体(あるいは抗原)を固定化した絹フィブリン膜は、抗体を固定化する場合の使用抗体量が従来の包括法により固定化したものに比べて少なく済み、抗体固定化量のより均一な膜である(試験例1)。そのため、この膜を免疫測定に使用した場合、バラツキのより少ない高精度の測定が可能になり(試験例1)、しかも免疫測定を行うのに十分な信号量が得られる(試験例2)。また、高純度の物質精製を目的としたアフィニティ担体としても有効に用いられる。特に、グルタルアルデヒド重合体あるいは塩化シアヌルを結合剤として用いたものは、膜からの抗体の脱離が少ないため繰り返し安定性に優れており、免疫センサー用の固定化膜として有効に利用出来る(試験例3)。

【図面の簡単な説明】

【図1】試験例3で用いたフロー式測定装置の概略図である。

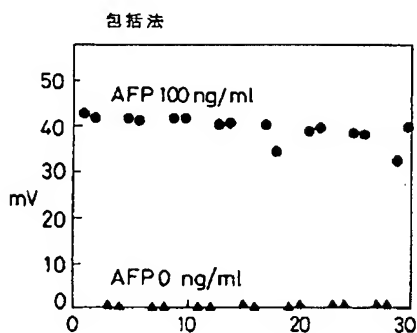
【図2】比較例1の抗体固定化絹フィブリン膜(包括法)を用いた免疫センサーの、繰り返し使用における安定性を示す図である。

【図3】実施例1の抗体固定化絹フィブリン膜(GA重合体法)を用いた免疫センサーの、繰り返し使用における安定性を示す図である。

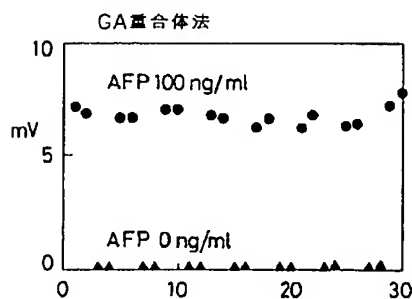
【図4】実施例2の抗体固定化絹フィブリン膜(塩化シアヌル法)を用いた免疫センサーの、繰り返し使用における安定性を示す図である。

【図5】実施例6で作成した免疫センサーの概略図を表わす。

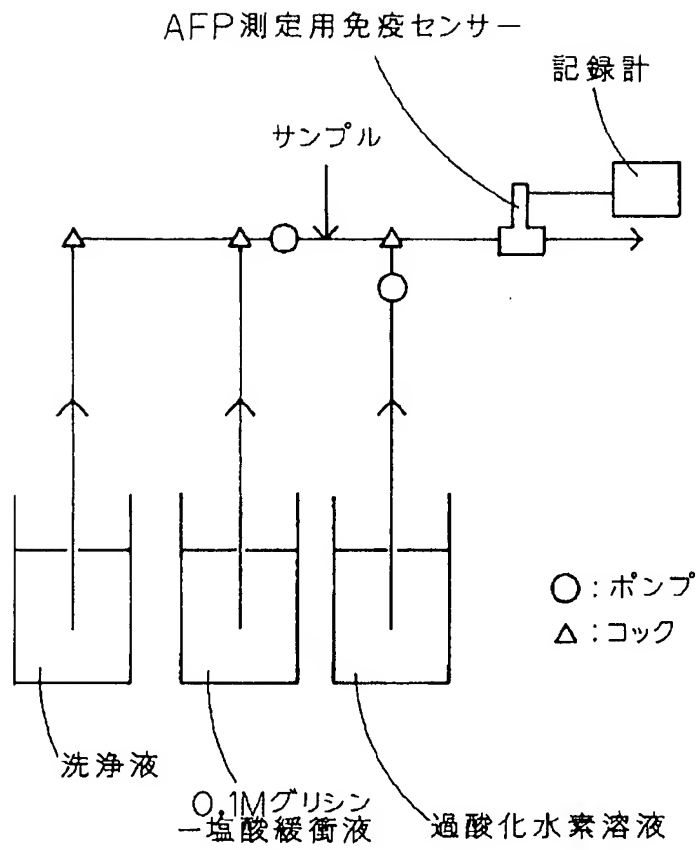
【図2】



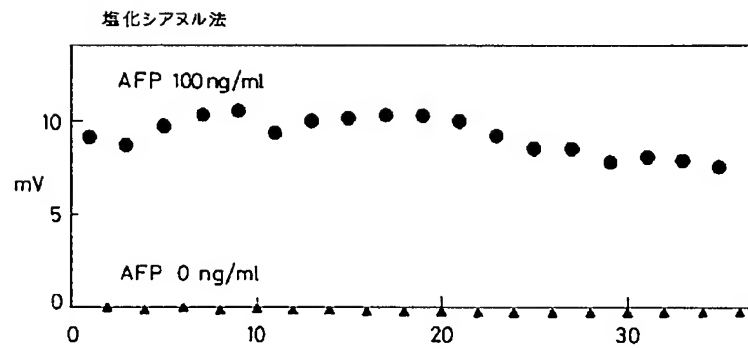
【図3】



【図1】



【図4】



【図5】

